DOI:10.11931/guihaia.gxzw202309018

大豆膨胀素基因 *GmEXPB5* 和 *GmEXPB7* 生物信息学及表达分析

马洪宇[1]，翟莹[1*]，张军[2]，陈炯辛[1]，张勇[3]，马天意[1]，李珊珊[1]

（1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院，黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省农业科学院 畜牧兽医分院，黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3. 黑龙江省农业科学院 克山分院，黑龙江 齐齐哈尔 161606)

摘 要：膨胀素（expansin，EXP）通过调控细胞壁的松弛在植物应对环境胁迫过程中起着重要作用。为研究 *EXP* 基因在大豆应对非生物胁迫过程中的作用，对大豆中的两个 *EXP* 基因（*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7）及其蛋白序列进行生物信息学分析，通过实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测基因表达量。结果表明：(1) *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 分别位于大豆第 10 和 12 号染色体上，编码的蛋白序列长度分别为 272 和 267 个氨基酸。GmEXPB5 蛋白分子量为 29.07 kD，理论等电点为 7.51；GmEXPB7 蛋白分子量为 29.09 kD，理论等电点为 8.66。GmEXPB5 和 GmEXPB7 均为稳定的亲水蛋白且定位于细胞壁中。GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白均含有一段信号肽序列和一个保守的 DPBB_1 结构域。(2) GmEXPB5 蛋白与鹰嘴豆 CaEXPB15 蛋白亲缘关系最近，GmEXPB7 蛋白与密花豆、赤豆和豇豆的 EXPB3 蛋白有着较近的亲缘关系。(3) *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在大豆根、茎和叶中均表达且它们在根和叶中的表达量均显著高于茎中的表达量。(4) *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在大豆幼苗中可以响应盐、干旱和低温胁迫。(5) *GmEXPB*5 启动子区域含有两种与逆境相关的顺式作用元件（ABRE 和 ARE）；*GmEXPB*7 启动子区域含有五种与逆境相关的顺式作用元件（ABRE、ARE、CGTCA-motif、TC-rich repeats 和 MBS）。上述结果表明，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 能够参与大豆对非生物胁迫的应答。

关键词：大豆，膨胀素，生物信息学分析，非生物胁迫，表达分析

中图分类号：Q943 **文献标识码**：A

Bioinformatics and expression analysis of expansin genes *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 in soybean

MA Hongyu[1], ZHAI Ying[1], ZHANG Jun[2], CHEN Jiongxin[1], ZHANG Yong[3], MA Tianyi[1], LI Shanshan[1]

(1. *College of Life Science and Agro-Forestry of Qiqihar University*, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. *Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences*, Qiqihar 161005, Heilongjiang, China; 3. *Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agriultural Sciences*, Qiqihar 161606, Heilongjiang, China)

Abstract: Expansin (EXP) plays an important role in plant response to environmental stress by regulating cell wall relaxation. To explore the role of *EXP* genes in soybean response to abiotic stress, two soybean *EXP* genes (*GmEXPB*5 and *GmEXPB*7) and their protein sequences were analyzed by bioinformatics, and their expression levels were detected by real-time fluorescent

基金项目：国家自然科学基金（32101694）；黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目（145109506）；高教强省科研专项科技成果产业化攻关项目（GJQSCYH-2022003）。

第一作者：马洪宇（1999-），硕士研究生，主要从事植物分子遗传育种研究，(E-mail) mhy1903381673@163.com。

*__通信作者__：翟莹，博士，教授，研究方向为植物分子遗传育种研究，(E-mail)fairy39809079@126.com。

quantitative PCR (qRT-PCR). The results were as follows: (1) The *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 were located on chromosomes 10 and 12 of soybean, and encoded proteins containing 272 and 267 amino acids, respectively. The molecular weight of GmEXPB5 protein was 29.07 kD and the theoretical isoelectric point was 7.51. The molecular weight of GmEXPB7 protein was 29.09 kD and the theoretical isoelectric point was 8.66. Both GmEXPB5 and GmEXPB7 were stable hydrophilic proteins localized in the cell wall. Both GmEXPB5 and GmEXPB7 proteins contained a signal peptide sequence and a conserved DPBB_1 domain. (2) GmEXPB5 was closely related to CaEXPB15 of chickpea, and GmEXPB7 was closely related to EXPB3 of chickpea, red bean and cowpea. (3) *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 were expressed in soybean roots, stems and leaves, and their expression levels in roots and leaves were significantly higher than those in stems. (4) *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 could respond to salt, drought and cold stresses in soybean seedlings. (5) The promoter region of *GmEXPB*5 contained two types of stress-related *cis*-elements (ABRE and ARE). The promoter region of *GmEXPB*7 contained five types of stress-related *cis*-elements (ABRE、ARE、CGTCA-motif、TC-rich repeats and MBS). These results indicated that *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 could participate in the response of soybean to abiotic stress.
Key words: soybean, expansin, bioinformatics analysis, abiotic stress, expression analysis

膨胀素（expansin，EXP）是一种参与改变植物细胞壁发育过程的非水解活性松弛蛋白，又称扩展蛋白。EXP 于 1992 年在酸诱导黄瓜下胚轴细胞壁伸长的研究中首次被发现（McQueen-Mason et al., 1992）。后续从植物细胞壁中纯化并鉴定出多种 EXP，如拟南芥、番茄、烟草和水稻等（张安等，2013）。EXP 广泛存在与植物中，主要包括 EXPA（α-expansin）、EXPB（β-expansin）、EXLA（Expansin-like A）和 EXLB（Expansin-like B）4 个亚家族（Sampedro et al., 2005）。其中，EXPA 和 EXPB 两个亚族蛋白数量在植物中占多数，EXPA 主要存在于双子叶植物和非禾本科单子叶植物中，而 EXPB 则多存在于禾本科单子叶植物中，EXLA 和 EXLB 数量和相关研究较少，最初是在水稻和拟南芥中发现（徐筱等，2010）。

研究表明，*EXP* 基因在调节细胞大小（Yin et al., 2023）、种子萌发（Yan et al., 2014）、根伸长（Noh et al., 2013）、叶生长（Zhou et al., 2015）、茎节间伸长（Kuluev et al., 2014）、气孔开合（Wei et al., 2011）、花发育（Kuluev et al., 2012）、果实软化成熟（Brummell et al., 1999; Jiang et al., 2019）、营养吸收（Zhou et al., 2014）和种子产量（Calderini et al., 2021）等植物生长发育过程中发挥重要功能。此外，*EXP* 基因参与调控植物非生物胁迫的研究也在逐渐开展。研究发现，干旱和缺磷条件能够诱导水稻 *OsEXPB*2 基因的表达（文文乙豪，2013）。遭遇盐胁迫时，玉米抗盐品种中 *ZmExpB*2、*ZmExpB*6 和 *ZmExpB*8 的表达量上调（Geilfus et al., 2010）。谷子 *SiEXPB*5 在干旱胁迫下表达量增加，其异源表达能够增强转基因拟南芥的抗旱性（王金荣，2020）。野生大豆 *GsEXPB*1 对促进大豆根系生长及耐盐性的提高起到积极作用（Feng et al., 2022）。野生大麦 *HvEXPB*7 通过促进根毛伸长来增强抗旱性（He et al., 2015）。过表达小麦 *TaEXPB*23 使转基因烟草抗旱性得到提高（Li et al., 2011），而 *TaEXPB*7-*B* 则参与转基因拟南芥对低温胁迫的耐受性（Feng et al., 2019）。与之相反，拟南芥 *AtEXP*3 和 *AtEXP-β*1 的过表达则提高了转基因植株对盐胁迫的敏感性（Kwon et al., 2008）。

大豆是植物油和蛋白质的主要来源之一，其特殊的固氮能力使其成为轮作系统和间作栽培模式中的高利润作物（Liu et al., 2020）。大豆在生长过程中易受高盐、干旱和低温等非生物胁迫的危害，它们不仅影响大豆的生长发育，还影响其产量和品质（盖钧镒，2003; Wang et al., 2003）。因此，大豆抗逆基因的挖掘对于大豆抗性品种的选育具有十分重要的意义。到目前为止，*EXPB* 基因与植物抗逆性的相关研究大多集中于禾本科作物。大豆中目前仅发

现 *GmEXPB*2 在非生物胁迫环境下与根系统的形态建成密切相关（Guo et al., 2011）。鉴于 *EXPB* 基因的研究可能对大豆抗逆性的改良及产量的提高发挥积极作用，而转录因子家族基因的功能又存在冗余性，因此有必要对大豆 *EXPB* 家族中的关键抗逆基因进行进一步的筛选和鉴定。本试验从大豆 *EXPB* 基因家族中选取 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 进行生物信息学分析，并对其在大豆根、茎、叶及非生物胁迫处理下的表达量进行检测，为大豆 *EXPB* 基因抗逆机制的研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用试验材料为黑龙江省西部地区广泛种植的耐旱大豆品种‘克山 1 号’，由黑龙江省农业科学院克山分院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析

从NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中下载大豆*GmEXPB*5和*GmEXPB*7的基因编码序列及蛋白质氨基酸序列。使用在线网站ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）进行蛋白质的基本理化性质分析。利用在线网站PSORT（https://www.genscript.com/tools/psort）预测蛋白质的亚细胞定位。利用在线网站SMART（https://smart.embl-heidelberg.de/）分析预测蛋白质序列的保守结构域及所在位置。使用DNAMAN 8软件进行蛋白质序列比对。利用在线网址MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）预测蛋白质保守基序（motif）。使用在线数据库Phytozome（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search）搜索并下载*GmEXPB*5和*GmEXPB*7的启动子序列，并利用在线软件PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）预测*GmEXPB*5和*GmEXPB*7启动子中的顺式作用元件。利用MEGA 7软件构建EXPB蛋白系统进化树。

1.2.2 大豆幼苗非生物胁迫处理

选择大小一致、饱满的大豆种子，于 2022 年 10 月均匀播撒在盛满无菌土的介质中，覆膜管理。待种子萌发，根长至 6~8 cm 时移入 Hoagland 营养液中培养，期间 2~3 天更换一次营养液。待幼苗长至第一片三出复叶完全展开时对其分别进行盐、干旱和低温胁迫处理。盐胁迫处理时将幼苗放入 NaCl 终浓度为 250 $mmoL\cdot L^{-1}$ 的营养液中；将幼苗放置在终浓度为 20% PEG8000 的营养液中模拟干旱胁迫处理；低温处理时将幼苗放置于 4 ℃恒温培养箱中。将未经处理的 0 h 以及胁迫处理后的 1、2、5、10、24 h 设置为取样时间点，在每个时间点分别取称 0.1 g 第 1 片三出复叶并于液氮中速冻。此外，分别称取 0.1 g 未处理的根和茎于液氮中速冻。所取样品材料均保存在-80 ℃超低温冰箱中。

1.2.3 RNA 的提取及 cDNA 合成

利用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂分别提取上述各样本的总 RNA。使用 Innovagene 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 第一链，-20 ℃ 冻存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

利用 Primer Premier 5.0 软件，根据 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物。qRT-PCR 内参基因选取大豆 *Gmβ-Tubulin* 基因（Qiu et al., 2020）。3 对 qRT-PCR 引物序列如表 1 所示，引物由长春生工生物公司合成。以各样品的 cDNA 为模版，使用 Innovagene 公司的 2×Taq SYBR Green qPCR Mix 试剂盒，在 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪上，对 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在根、茎、叶及非生物胁迫下的表达量进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 的程序设置和体系参照 Qiu 等（2020），所有处理均采用 3 次重复，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的基因相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因 Genes	上游引物（5′-3′） Forward primers（5′-3′）	下游引物（5′-3′） Reverse primers（5′-3′）
Gmβ-Tubulin	GGAAGGCTTTCTTGCATTGGTA	AGTGGCATCCTGGTACTGC
*GmEXPB*5	GCTCCCTTCCTCTTGTTTCAATCCC	CAAGCACCACCTTCACTTCCATCC
*GmEXPB*7	GAAGGGTGTGGTGCGTGCTAC	AGATCGAAGTGTGTTTGGTCAGAGG

2 结果与分析

2.1 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基因及蛋白序列分析

2.1.1 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基本理化性质分析

从 NCBI 数据库中获取两个功能未被鉴定的大豆 *EXPB* 基因，*GmEXPB*5（Genebank 登录号：NM001261433）和 *GmEXPB*7（Genebank 登录号：NM001267069）。如表 2 所示，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基因分别位于大豆第 10 和 12 号染色体上，编码的蛋白序列长度分别为 272 和 267 个氨基酸。预测 GmEXPB5 蛋白分子量为 29.07 kD，理论等电点为 7.51；GmEXPB7 蛋白分子量为 29.09 kD，理论等电点为 8.66。GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白的不稳定系数均小于 40，亲水性指数均为负值，表明它们均为稳定的亲水蛋白。亚细胞定位预测结果显示，GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白均定位于细胞壁中。

表 2　大豆 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基本信息及特征

Table 2　Basic information and characteristics of soybean *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7

基因 Genes	染色体位置 Location	氨基酸数 Number of amino acid（aa）	分子量 Molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	亲水性指数 Hydrophilic index	亚细胞定位 Subcellular localization
*GmEXPB*5	chr10	272	29.07	7.51	29.28	-0.013	细胞壁 Cell wall
*GmEXPB*7	chr12	267	29.01	8.66	31.08	-0.132	细胞壁 Cell wall

2.1.2 GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白保守结构域及保守基序（Motif）分析

GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白的氨基酸序列如图 1 所示，它们的同源性为 45.79%。在 GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白序列的 N 端均含有一段信号肽序列（GmEXPB5：1 到 29 位氨基酸；GmEXPB7：1 到 31 位氨基酸），它们能够引导 EXPB 蛋白定位于细胞壁。此外，GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白均含有一个保守的 81 个氨基酸残基组成的 DPBB_1 结构域（GmEXPB5：83 到 163 位氨基酸；GmEXPB7：78 到 158 位氨基酸），此结构域是 EXP 家族蛋白的共有结构域。

```
GmEXPB5    ASTLHR L H LTLVA  SIL   PSSCFNPRKIVNASY    40
GmEXPB7    QLHRVS A K SLTCL  ALK   LYAAEA.....QLQH    35
Consensus m      a s l     sl   lvl

GmEXPB5   NSNG Y S AV     P H    E     F SV G P  S    80
GmEXPB7   RGPD H Y GT     D E    T     Y TM D K  R    75
Consensus     l w p  atwyg p gdgs ggacg g  v v pf

GmEXPB5   SMIS GS    ES K   F  E   TGN G  GNP R V    120
GmEXPB7   ARVG LG    MK E   A  K   LDK I  RRA T I    115
Consensus     a  pllf  g gcg cy vkc   s cs   v v i

GmEXPB5       A  SDA F      T   A  VS QDEK  NA K A   160
GmEXPB7       P  PSD T      A   R  IA ENGP  DR Q P   155
Consensus tdec gc   q hfdlsg afg ma  g    lr  g i

GmEXPB5   IQ   VE N   VY     DL  N EYFAVCA Y  GN     200
GmEXPB7   VI   TP K   RK     NE  T FWLSLLV F  AE     195
Consensus   yrr  c ypg  iafhv  gs p       e ed  gd

GmEXPB5   LDKVELK  F AS YS QRS   I KLSK S  KA   IR   240
GmEXPB7   IGSMHIR  G TE LQ NHL   N CIIG .  RG   VK   234
Consensus        ea s  w  m   wga w    g pl  pfs

GmEXPB5    TD . K VV NN   SG K GQ  R IV  RI          272
GmEXPB7    SS T R LS RD   TN V KA  T RL  YP          267
Consensus l  s g s  a  vip  w p  ty s  nf
```

图 1　GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1　Comparison of amino acid sequences of GmEXPB5 and GmEXPB7 proteins

蛋白保守基序（Motif）分析结果如图 2 所示，GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白共含有 10 个 Motif。其中，Motif 3、Motif 1、Motif 5、Motif 2、Motif 7 和 Motif 4 为 GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白共有且它们在两个蛋白序列中的分布位置和顺序基本相同；Motif 10、Motif 9 为 GmEXPB5 蛋白所特有，它们位于 GmEXPB5 蛋白序列 N 端；Motif 8、Motif 6 为 GmEXPB7 蛋白所特有，它们同样也位于 GmEXPB7 蛋白序列 N 端。

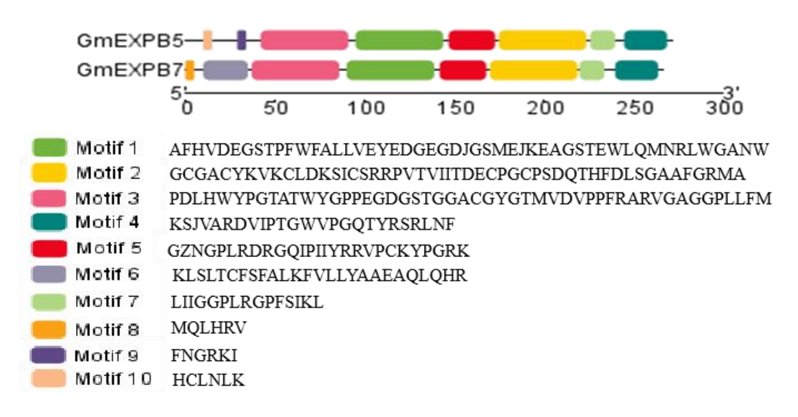
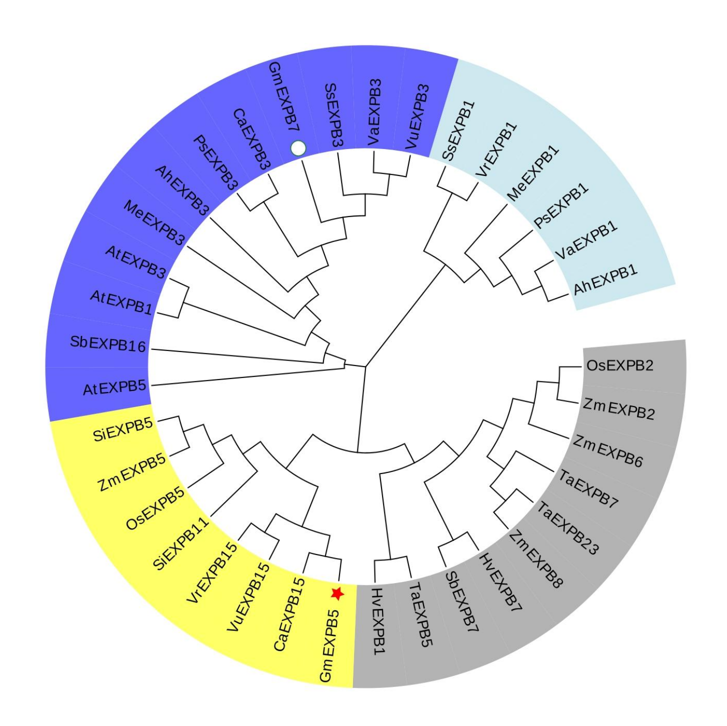


图 2　GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白 Motif 预测

Fig. 2　Motif prediction of GmEXPB5 and GmEXPB7 proteins

2.1.3 植物 EXPB 蛋白系统进化分析

将 16 种植物中的 36 个 EXPB 蛋白构建系统进化树。由图 3 可知，GmEXPB5 蛋白与鹰嘴豆 CaEXPB15 蛋白亲缘关系最近，GmEXPB7 蛋白则与密花豆、赤豆和豇豆的 EXPB3 蛋白有着较高的亲缘关系。此外，除拟南芥外其他双子叶植物 EXPB1 蛋白均处于同一分支，说明同一基因在不同物种中仍具有较高同源性，但相同植物中的 EXPB 蛋白则存在较大差异，如 GmEXPB5 蛋白和 GmEXPB7 蛋白亲缘关系较远。



Ah. 落花生；**At**. 拟南芥；**Ca**. 鹰嘴豆；**Gm**. 大豆；**Hv**. 大麦；**Me**. 木薯；**Os**. 水稻；**Ps**. 豌豆；**Sb**. 高粱；**Si**. 谷子；**Ss**. 密花豆；**Ta**. 小麦；**Va**. 赤豆；**Vr**. 绿豆；**Vu**. 豇豆；**Zm**. 玉米。

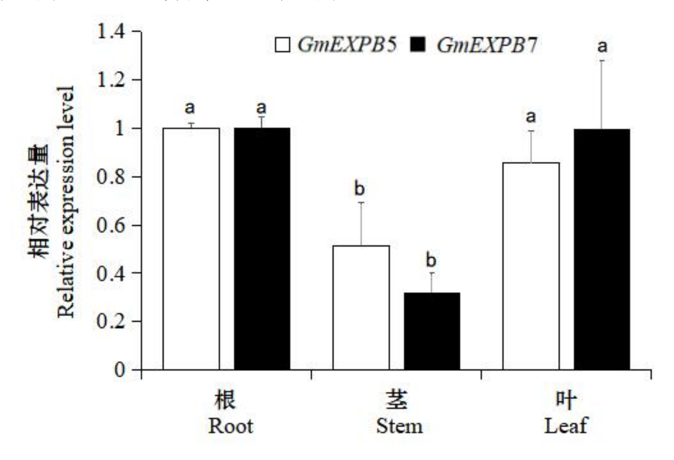
Ah. *Arachis hypogaea*; **At**. *Arabidopsis thaliana*; **Ca**. *Cicer arietinum*; **Gm**. *Glycine max*; **Hv**. *Hordeum vulgare*; **Me**. *Manihot esculenta*; **Os**. *Oryza sativa*; **Ps**. *Pisum sativum*; **Sb**. *Sorghum bicolor*; **Si**. *Setaria italica* var. *germanica*; **Ss**. *Spatholobus suberectus*; **Ta**. *Triticum aestivum*; **Va**. *Vigna angularis*; **Vr**. *V. radiata*; **Vu**. *V. unguiculata*; **Zm**. *Zea mays*.

图 3　植物 EXPB 蛋白系统进化分析

Fig. 3　Phylogenetic analysis of plant EXPB proteins

2.2 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在大豆根、茎和叶中的表达分析

qRT-PCR 结果（图 4）显示，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在大豆根、茎和叶中均有表达，但它们在根和叶中的表达量显著高于茎中的表达量。



不同小写字母表示同一基因差异显著（$P<0.05$），下同。

Different lowercase letters indicate significant differences in the same gene($P<0.05$), the same below.

图 4　*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在根、茎和叶中的表达量

Fig. 4　Expression of *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 in roots, stems and leaves

2.3 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 非生物胁迫表达分析

对大豆幼苗分别进行盐、干旱和低温胁迫处理。qRT-PCR 检测结果如图 5 所示，盐胁迫处理后，*GmEXPB*5 的表达量先升高，在处理 1 h 时达到最大值，为对照 0 h 表达量的 6.9 倍，之后下降，到处理 24 h 时与对照 0 h 时的表达量已无明显差异；*GmEXPB*7 的表达量在处理后的 1、5、24 h 时均显著高于对照 0 h 时的表达量且 24 h 时的表达量达到最大值，为对照 0 h 表达量的 14.2 倍。干旱胁迫处理后，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达量均存在先降低后升高的趋势，在处理 24 h 时 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达量均达到最大值，分别为对照 0 h 表达量的 3.9 和 5.6 倍。低温胁迫处理后，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达量均下降，显著低于对照 0 h 时的表达量。由以上结果推测，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 均可以参与大豆幼苗对非生物胁迫的应答。

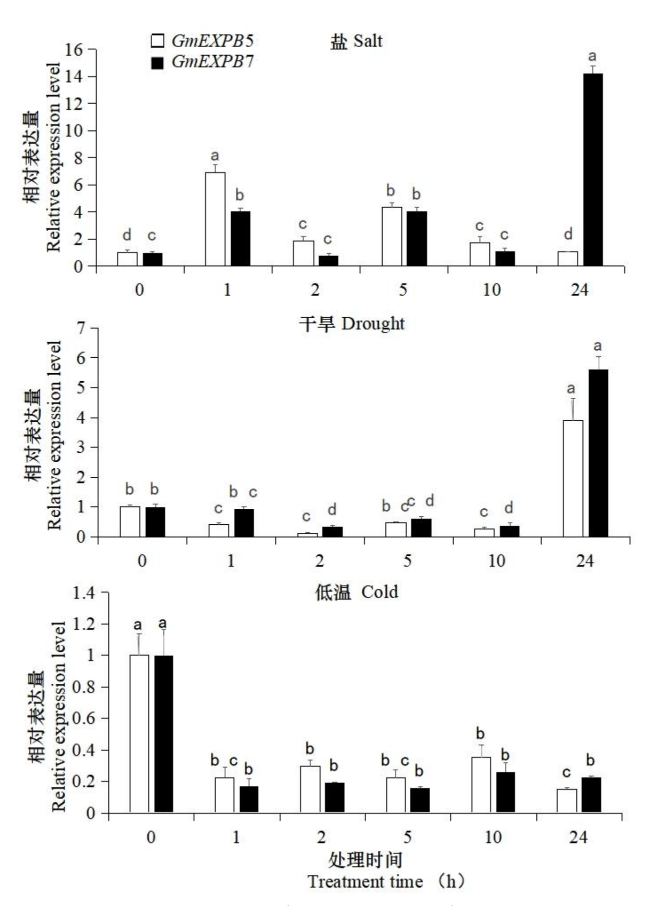


图 5　*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在盐、干旱和低温胁迫处理下的表达量

Fig. 5　Expression of *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 under salt, drought and cold stresses

2.4 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 启动子顺式作用元件预测分析

对 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基因起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列中潜在的逆境相关顺式作用元件进行预测分析。结果如表 3 所示，*GmEXPB*5 的启动子区域含有两种与逆境有关的顺式作用元件，分别是 2 个脱落酸响应元件（ABRE）和 3 个厌氧诱导元件（ARE）；*GmEXPB*7 的启动子区域含有 5 种与逆境有关的顺式作用元件，分别是 4 个脱落酸响应元件（ABRE）、3 个厌氧诱导元件（ARE）、1 个茉莉酸甲酯响应元件（CGTCA-motif）、1 个防御和胁迫响应元件（TC-rich repeats）以及 1 个干旱诱导的 MYB 转录因子结合位点（MBS）。

表 3　*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 启动子顺式作用元件预测

Table 3　Prediction of *cis*-elements in *GmEXPB*5 and *GmEXPB*7 promoters

顺式元件 *Cis*-element	序列 Sequence	预测功能 Predicted function	数量 Amount
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件 ABA responsive element	*GmEXPB*5：2 *GmEXPB*7：4
ARE	AAACCA	厌氧诱导元件 Anaerobic induction element	*GmEXPB*5：3 *GmEXPB*7：3
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA responsive element	*GmEXPB*5：0 *GmEXPB*7：1
MBS	CAACTG	干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility	*GmEXPB*5：0 *GmEXPB*7：1
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	防御和胁迫响应元件 Defense and stress responsive element	*GmEXPB*5：0 *GmEXPB*7：1

3 讨论与结论

细胞壁是植物响应和防御外界环境胁迫的首道屏障，细胞壁结构和组成的改变是植物适应外界环境胁迫的重要机制之一。EXP 作为一种酶蛋白能够以非水解的方式作用于细胞壁，在不改变细胞壁共价结构的同时打断多糖间交联的氢键，从而增加细胞壁的柔韧性，促进细胞的生长和伸长（Feng et al., 2019）。因此，EXP 可以通过重塑细胞壁的结构来协助植物抵御外界不利环境条件（Lü et al., 2013; Li et al., 2015）。前人发现大豆中存在 9 个 *EXPB* 基因（Zhu et al., 2014），本研究对其中的 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 进行了生物信息学分析。在 GmEXPB5 和 GmEXPB7 蛋白序列 N 端均预测到信号肽序列，同样亚细胞定位预测结果也显示它们定位在细胞壁中，这与大多数已报到的 EXPB 蛋白属于细胞壁蛋白这一结论相吻合（Choi et al., 2008）。但本试验中的亚细胞定位结果仅为软件预测，在后续的基因功能研究中应选择合适的表达系统进行实验验证。蛋白系统进化分析结果显示，尽管 GmEXPB5 蛋白和 GmEXPB7 蛋白的亲缘关系并不近，但与它们各自亲缘关系较近的 EXPB 蛋白仍来自豆科植物。

前人研究发现，部分 *EXP* 基因在植物中的表达具有一定的组织特异性，例如水稻 *OsEXPB*5 和大麦 *HvEXPB*1 在根毛中特异性表达（Won et al., 2010）；小麦 *EXP* 基因在不同组织器官中也存在差异表达且具有表达偏好性，在根中的表达量普遍较高（Han et al., 2019）；而烟草 *NtabEXPA*12 则主要在叶片中表达，可能参与烟叶生长发育的调控（丁安明等，2021）。在本研究中，尽管 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达不具有组织特异性，但它们在根和叶中的表达量仍显著高于茎中的表达量，推测 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 在大豆的根、叶以及茎叶均能够发挥转录调控作用。

*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 可以参与大豆幼苗对非生物胁迫的应答，但它们的转录对盐、干旱和低温胁迫的响应不同。总体来说，盐和干旱胁迫可以诱导 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达，但低温胁迫则抑制了 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的表达。冯珊珊等（2020）推测，*TaEXPB*12-*A/B/D* 基因在低温胁迫下表达量的下降可能是为了减少根的表面积，从而减少低温胁迫所造成的伤害，而干旱胁迫下基因表达量的升高可能是植物为了增强吸水能力而促进根毛生长的缘故。Han 等（2019）推测，小麦 *EXP* 基因在盐胁迫下的上调表达还可能在维持细胞内 Na^+和 K^+平衡中起重要作用。由此可以预见 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 可能在大豆抗盐和抗旱基因工程育种中存在潜在的应用价值。Han 等（2019）报道，不同 *EXP* 基因亚家

族之间存在较大的结构差异，但同一亚家族内 *EXP* 基因具有较高的保守性，结构比较相似。尽管本研究中 GmEXPB5 蛋白和 GmEXPB7 蛋白的亲缘关系较远，但它们的组织表达模式和非生物胁迫表达模式总体来说仍比较类似，由此推测它们在功能上可能也存在着一定的相似性。当然，同一基因在植物不同组织中执行的功能也并不完全相同，其转录水平的差异也并不一定代表其发挥作用的大小（Feng et al., 2022）。

基因的表达调控与基因启动子中的顺式作用元件密切相关（Lu et al., 2018）。*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的基因表达均受非生物胁迫的调控，于是我们对它们启动子中逆境相关的顺式作用元件进行预测分析。所得结果与预期相符，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 的启动子区域均含有多个激素和逆境响应相关的顺式作用元件。脱落酸和茉莉酸等植物激素及其信号转导途径在环境胁迫过程中均起重要作用（杨瑞瑞等，2022）。*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 启动子中脱落酸和茉莉酸甲酯响应元件的存在表明它们可能通过响应一种或多种激素参与大豆对逆境胁迫的应答。盐和干旱胁迫能够显著诱导小麦部分 *EXP* 基因的表达也与它们启动子区含有数量不等的逆境相关顺式元件有关（Han et al., 2019）。预测分析结果显示，*GmEXPB*7 启动子中逆境响应元件的种类及数量均大于 *GmEXPB*5 启动子，推测这也是导致 *GmEXPB*7 对盐和干旱胁迫的响应程度强于 *GmEXPB*5 响应程度的原因。

综上所述，*GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 均能参与大豆对非生物胁迫的应答，此研究为 *GmEXPB*5 和 *GmEXPB*7 基因的后续功能研究提供了理论依据。此外，大豆 *EXP* 基因家族成员众多，后续也有必要对其他基因的功能进行深入的挖掘和研究。

参考文献：

BRUMMELL DA, HARPSTER MH, CIVELLO PM, et al., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening[J]. Plant Cell, 11(11): 2203-2216.

CALDERINI DF, CASTILLO FM, ARENAS-M A, et al., 2021. Overcoming the trade-off between grain weight and number in wheat by the ectopic expression of expansin in developing seeds leads to increased yield potential[J]. New Phytol, 230(2): 629-640.

CHOI D, KIM JH, LEE Y, 2008. Expansins in plant development[J]. Adv Bot Res, 47: 47-97.

DING AM, CHEN ZH, YANG YD, et al., 2021. Overexpression of *NtabEXPA*12 affects leaf development and abiotic stress tolerance in tobacco[J]. Chin Tobacco Sci, 42(4): 58-66. [丁安明, 陈志华, 杨懿德, 等, 2021. *NtabEXPA12* 基因过表达对烟草叶片发育及抗逆性的影响[J]. 中国烟草科学, 42(4): 58-66.]

FENG X, XU Y, PENG L, et al., 2019. *TaEXPB7-B*, a β-expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*[J]. J Plant Physiol, 240: 153004.

FENG SS, XU YQ, ZHAO ZY, et al., 2020. Cloning and function verification of *TaEXPB12* homologous genes in frigid region winter wheat[J]. Acta Agric Boreal-Sin, 35(6): 74-80. [冯珊珊, 徐永清, 赵梓颐, 等, 2020. 寒地冬小麦膨胀素基因 *TaEXPB12* 同源基因的克隆及功能分析[J]. 华北农学报, 35(6): 74-80.]

FENG X, LI C, HE F, et al., 2022. Genome-wide identification of expansin genes in wild soybean (*Glycine soja*) and functional characterization of *Expansin B1* (*GsEXPB1*) in soybean hair root[J]. Int J Mol Sci, 23(10): 5407.

GAI JY, 2003. Expanding and enhancing the research allocation on soybean breeding and genetics for the establishment of market supply based on domestic production[J]. Eng Sci, 5(5): 1-6. [盖钧镒, 2003. 发展我国大豆遗传改良事业解决国内大豆供给问题[J]. 中国工程科学,

5(5): 1-6.]

GEILFUS CM, ZÖRB C, MÜHLING KH, 2010. Salt stress differentially affects growth-mediating β-expansins in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.)[J]. Plant Physiol Biochem, 48(12): 993-998.

GUO W, ZHAO J, LI X, et al., 2011. A soybean β-expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses[J]. Plant J, 66(3): 541-552.

HAN Z, LIU Y, DENG X, et al., 2019. Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. BMC Genomics, 20(1): 101.

HE X, ZENG J, CAO F, et al., 2015. *HvEXPB7*, a novel β-expansin gene revealed by the root hair transcriptome of Tibetan wild barley, improves root hair growth under drought stress[J]. J Exp Bot, 66(22): 7405-7419.

JIANG F, LOPEZ A, JEON S, et al., 2019. Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated poly-galacturonase and expansin influences tomato cracking[J]. Hortic Res, 6: 17.

KULUEV BR, KNYAZEV AB, LEBEDEV YP, et al., 2012. Morphological and physiological characteristics of transgenic tobacco plants expressing expansin genes: *AtEXP10* from *Arabidopsis* and *PnEXPA1* from poplar[J]. Russ J Plant Physiol, 59(1): 97-104.

KULUEV BR, KNYAZEV AV, NIKONOROV LM, et al., 2014. Role of the expansin genes *NtEXPA1* and *NtEXPA4* in the regulation of cell extension during tobacco leaf growth[J]. Russ J Genet, 50(5): 560-569.

KWON YR, LEE HJ, KIM KH, et al., 2008. Ectopic expression of *Expansin*3 or *Expansinβ*1 causes enhanced hormone and salt stress sensitivity in Arabidopsis[J]. Biotechnol Lett, 30(7): 1281-1288.

LI F, XING S, GUO Q, et al., 2011. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco[J]. J Plant Physiol, 168(9): 960-966.

LI W, WANG F, WANG J, et al., 2015. Overexpressing *CYP71Z2* enhances resistance to bacterial blight by suppressing auxin biosynthesis in rice[J]. PLoS ONE, 10(3): e0119867.

LIU S, ZHANG M, FENG F, et al., 2020. Toward a “green revolution” for soybean[J]. Mol Plant, 13(5): 688-697.

LU SJ, YI SS, ZHANG JQ, et al., 2018. Isolation and functional characterization of the promoter of *SEPALLATA3* gene in London plane and its application in genetic engineering of sterility[J]. Plant Cell Tiss Org, 136(6): 109-121.

LÜ P, KANG M, JIANG X, et al., 2013. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*[J]. Planta, 237(6): 1547-1559.

MCQUEEN-MASON S, DURACHKO DM, COSGROVE DJ, 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants[J]. Plant Cell, 4(11): 1425-1433.

NOH SA, LEE HS, KIM YS, et al., 2013. Down-regulation of the *IbEXP1* gene enhanced storage root development in sweetpotato[J]. J Exp Bot, 64(1): 129-142.

QIU S, ZHANG J, HE JQ, et al., 2020. Overexpression of *GmGolS2-1*, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance[J]. Plant Cell Tiss Org, 143(3): 507-516.

SAMPEDRO J, COSGROVE DJ, 2005. The expansin superfamily[J]. Genome Biol, 6(12): 242.

WANG WX, VINOCUR B, ALTMAN A, 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme

temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta, 218(1): 1-14.
WANG JR, 2020. Identification, expression and functional analysis of the expansin gene family in foxtail millet during germination[D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University. [王金荣, 2020. 谷子萌发期扩展蛋白基因家族的鉴定、表达和功能分析[D]. 晋中: 山西农业大学.]
WEI PC, ZHANG XQ, ZHAO P, et al., 2011. Regulation of stomatal opening by the guard cell expansin *AtEXPA1*[J]. Plant Signal Behav, 6(5): 740-742.
WEN WYH, 2013. Functional analysis of *OsEXPB2* in rice (*Oryza sativa*)[D]. Chongqing: Chongqing University. [文文乙豪, 2013. 水稻 *OsEXPB2* 基因的功能研究[D]. 重庆: 重庆大学.]
WON SK, CHOI SB, KUMARI S, et al., 2010. Root hair-specific EXPANSIN B genes have been selected for Graminaceae root hairs[J]. Mol Cells, 30(4): 369-376.
XU X, XU Q, ZHANG L, et al., 2010. Advancements in expansin genes of plants[J]. J Beijing For Univ, 32(5): 154-162. [徐筱, 徐倩, 张磂, 等, 2010. 植物扩展蛋白基因的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 32(5): 154-162.]
YAN A, WU M, YAN L, et al., 2014. *AtEXP2* is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*[J]. PLoS ONE, 9(1): e85208.
YANG RR, LI XS, LIANG YQ, et al., 2022. Research progress on the role and mechanism of phytohormones in bryophyte growth, development and stress response [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 42(3): 527-540. [杨瑞瑞, 李小双, 梁玉青, 等, 2022. 植物激素在苔藓生长发育与逆境响应过程中的作用机制研究进展[J]. 西北植物学报, 42(3): 527-540.]
YIN Z, ZHOU F, CHEN Y, et al., 2023. Genome-wide analysis of the expansin gene family in *Populus* and characterization of expression changes in response to phytohormone (abscisic acid) and abiotic (low-temperature) stresses[J]. Int J Mol Sci, 24(9): 7759.
ZHANG A, CAO QH, ZHOU ZL, et al., 2013. Research progress of plant cell wall relaxation factor-Expansin[J]. Jiangsu Agric Sci, 41(6): 11-13. [张安, 曹清河, 周志林, 等, 2013. 植物细胞壁松弛因子-Expansin 研究进展[J]. 江苏农业科学, 41(6): 11-13.]
ZHOU J, XIE J, LIAO H, et al., 2014. Overexpression of β-expansin gene *GmEXPB2* improves phosphorus efficiency in soybean[J]. Physiol Plant, 150(2): 194-204.
ZHOU S, HAN YY, CHEN Y, et al., 2015. The involvement of expansins in response to water stress during leaf development in wheat[J]. J Plant Physiol, 183: 64-74.
ZHU Y, WU N, SONG W, et al., 2014. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies[J]. BMC Plant Biol, 14: 93.